REPARATUR VON EINZELSTRANGBRÜCHEN IN DER DNA VON HEFE NACH RÖNTGENBESTRAHLUNG DER ZELLEN

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biologie

der Johann Wolfgang Goethe-Universität

zu Frankfurt am Main

von

Bernhard Ogorek

aus Offenbach

Frankfurt am Main, ~~1983~~ 1984

Mit Genehmigung des Fachbereichs Biologie zum Druck gekürzt. Ein Exemplar der ungekürzten Arbeit liegt der Senckenbergischen Bibliothek der Universität vor.

Die vorliegende Arbeit wurde bei der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung mbH, Abteilung für Biophysikalische Strahlenforschung in Frankfurt/M. unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. W. Pohlit durchgeführt.

UNIV. LIBRARY

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Biologie der Universität Frankfurt am Main

Dekan: Prof. Dr. H.-W. Kohlenbach

1. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Brendel
2. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Pohlit

Tag der mündlichen Prüfung: 11. 1. 1984

Die Effekte ionisierender Strahlung auf Organismen beruhen in erster Linie auf in den Chromosomen induzierten Schäden (1; 2). Fehlerfreie und fehlerhafte Reparaturmechanismen können die DNA-Läsionen teilweise oder vollständig beseitigen und dadurch die Strahlenwirkung vermindern.

Unter den bisher biochemisch identifizierbaren strahleninduzierten DNA-Veränderungen wurden Doppelstrangbrüche als kritische Schäden für die Zellinaktivierung angesehen (3; 4; 5). Aber auch Einzelstrangbrüche können zur biologischen Strahlenwirkung beitragen, da sie die Primär- und Sekundärstruktur der DNA verändern, verdrehte Schleifen ("supercoiled loops") entspannen und dadurch die Replikation der DNA und die Transkription behindern. Befinden sich Einzelstrangbrüche im komplementären Strang Basenschäden direkt gegenüber, so treten bei der Reparatur solcher Doppelstrangschäden sekundäre Doppelstrangbrüche in Säugerzellen auf (6; 7), wobei wahrscheinlich auch Punktmutationen erzeugt werden.

Für DNA-Reparaturstudien hat sich der einzellige Eukaryont Saccharomyces cerevisiae als geeignetes Testsystem erwiesen. Untersuchungen mit Hefe auf molekularer Ebene bieten gegenüber entsprechenden Studien mit Säugerzellen die entscheidenten Vorteile, daß Mutanten mit unterschiedlichen Reparaturkapazitäten zur Verfügung stehen und daß alle Experimente im selben Dosisbereich durchgeführt werden können, in dem sich genetische Strahleneffekte und das Zellüberleben feststellen lassen.

Das Ziel dieser Dissertation bestand darin, die Zahl der Einzelstrangbrüche in der Hefe-DNA unmittelbar nach der Bestrahlung der Zellen zu bestimmen und die Kinetik des Verschwindens der Brüche zu verfolgen, die entweder durch fehlerfreie oder fehlerhafte Reparatur beseitigt werden.

Zum Nachweis der Einzelstrangbrüche wurde anstelle der bekannten, aber aufwendigen Technik der Sedimentation von DNA im alkalischen Sucrosegradienten die relativ einfache und schnelle DNA-Entwindungsmethode (8; 9; 10) verwendet. Diese Methode, mit der sich Strangbrüche bisher nur in Säuger- und Bakterienzellen nachweisen ließen, wurde so modifiziert, daß sie auf Hefezellen angewendet werden kann. Zu diesem Zweck mußte geprüft werden, wie sich die Hefe-DNA bei den einzelnen Schritten dieser Methode verhält.

Die Affinität einzel- und doppelsträngiger Hefe-DNA zum Hydroxylapatit wurde untersucht und die Bedingungen für die bestmögliche chromatographische Trennung der beiden DNA-Konformationen wurden ermittelt.

Das Entwindungsverhalten der Hefe-DNA innerhalb des Zellwandgerüsts wurde in Abhängigkeit von Strahlendosis, Zeit und der NaOH- und Salzkonzentration der Entwindungslösung untersucht. Anhand der erhaltenen Kinetiken ließen sich optimale Entwindungsbedingungen für Reparaturstudien nach Röntgenbestrahlung der Zellen festlegen.

Verschiedene mechanische und enzymatische Methoden wurden auf ihre Fähigkeit hin überprüft, die stabilen Zellwandgerüste alkalibehandelter Hefen zu zerstören und die DNA daraus freizusetzen. Als optimale Methode für diesen Zweck erwies sich die enzymatische Teilverdauung des Wandgerüsts in Kombination mit einer Detergens- und Ultraschallbehandlung.

Die auf intakte Hefe angewandte DNA-Entwindungsmethode umfaßt folgende Schritte:

1) DNA-spezifisch markierte und röntgenbestrahlte Hefezellen werden 2 h in alkalischer Lösung (0,03 M NaOH; 0,15 M NaCl) bei 0^{o}C inkubiert. Die Natronlauge dringt in die Zellen ein. Unter ihrer Wirkung denaturiert, ausgehend von den Strangbrüchen, ein begrenzter Teil der DNA.
2) Das Aufschmelzen der DNA wird durch Neutralisation der Lösung unterbrochen und die partiell entwundene DNA wird durch Ultraschallbehandlung der Suspension in kurze einzel- und doppelsträngige Bruchstücke zerlegt.
3) Die Zellhüllen, welche die DNA-Fragmente enthalten, werden durch enzymatische Behandlung teilweise abgebaut.
4) Durch Inkubation der angedauten Hüllen in einer Detergenslösung und eine zweite Ultraschallbehandlung der Suspension werden die DNA-Fragmente aus den partiell zerstörten Wandgerüsten freigesetzt.
5) Die Fragmente einzel- und doppelsträngiger DNA werden durch Hydroxylapatit-Chromatographie voneinander getrennt und die in den beiden Fraktionen enthaltene Aktivität gemessen.
6) Der Anteil der Masse doppelsträngiger DNA an der Masse der Gesamt-DNA gilt als Maß für die Zahl der ursprünglich in den Hefechromosomen vorhandenen Brüche.

Die mit der relativen DNA-Entwindungsmethode erhaltenen Meßwerte wurden mit aus der Literatur entnommenen Daten der absoluten Methode der alkalischen Sucrosegradientensedimentation geeicht.

Einzel- und Doppelstrangbrüche lassen die DNA mit unterschiedlichen Kinetiken entwinden. Ein Doppelstrangbruch führt zur Denaturierung der

3 bis 6-fachen DNA-Masse, die ein Einzelstrangbruch entwinden läßt.

Mit dem Alter der Zellkultur und mit fortschreitender Inkubationszeit der Zellen in Reparaturmedium ändert sich (bei konstant gehaltenen Entwindungsbedingungen) das Denaturierungsverhalten der Hefe-DNA, d.h. pro Strangbruch entwindet zunehmend weniger DNA-Masse. Aus diesem Grund sind exakte Reparaturmessungen über längere Zeiträume mit der auf intakte Zellen angewandten Entwindungsmethode nicht möglich.

In 3 verschiedenen Hefestämmen verläuft die Strangbruchreparatur unter Nichtwuchs-Bedingungen (Inkubation der bestrahlten Zellen in Glucosepuffer bei $30^{o}C$) nach Röntgenbestrahlung mit Dosen von 0 bis 2400 Gy unabhängig von der Dosis. Innerhalb einer Stunde sind alle Einzelstrangbrüche aus der DNA entfernt. Es zeichnen sich 2 Komponenten der Einzelstrangbruch-Reparatur ab. Der Mechanismus der "schnellen" Komponente repariert ca. 80% der induzierten Brüche mit einer Zeitkonstanten (t_{37}) von etwa 2 min, der Mechanismus der "langsamen" Komponente ca. 20% der Brüche mit einer t_{37} von etwa 15 min.

Es wird vermutet, daß die beiden sich abzeichnenden Komponenten die Reparatur zweier unterschiedlicher Klassen von Einzelstrangbrüchen widerspiegeln.

Es gibt keine Anzeichen dafür, daß in bestrahlten Hefezellen während der Reparatur von DNA-Doppelschäden (Einzelstrangbrüche, die Basenschäden im komplementären Strang direkt gegenüber liegen) sekundäre Doppelstrangbrüche auftreten. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den Befunden mit bestrahlten Säugerzellen (6; 7).

Während der Inkubation der Zellen in Wuchsmedium verläuft die Einzelstrangbruch-Reparatur in ähnlicher oder gleicher Weise wie in glucosehaltigem Puffer. In glucosefreiem Puffer bzw. in A. dest. werden dagegen nur 60 bis 80% der induzierten Einzelstrangbrüche repariert. Die unter diesen Bedingungen nicht reparablen Brüche werden aus der DNA entfernt, sobald die Hefe in ein glucosehaltiges Medium überführt wird. Es findet keine Schadensfixierung statt.

Bei $0^{o}C$ werden innerhalb von 24 h ca. 80% der Brüche repariert. Die Strangbruchreparatur verläuft bei dieser Temperatur etwa 100 mal langsamer als bei $30^{o}C$ unter sonst identischen Bedingungen.

Verglichen mit anderen physiologischen Leistungen der Hefe, wie z.B. der Zellvermehrung oder der Reparatur von UV-Dimeren, die bei $0^{o}C$ vollständig

blockiert sind, stellt die Fähigkeit der Hefe, bei dieser Temperatur Einzelstrangbrüche reparieren zu können, einen physiologischen Sonderfall dar.

Literatur:

1. Rytömaa, T., J. Saltevo, and H. Toivonen (1979), in: Int. Symp. Biol., Implications of Radionuclids Released from Nuclear Industries JAEA-SM 237/10, Int. Atomic Energy Agency, Wien

2. Painter, R.B. (1980), in: R.E. Meyn, and H.R. Withers (Eds.) Radiation Biology in Cancer Research, Raven Press, New York, pp. 59-68

3. Resnick, M.A., and P. Martin (1976), Mol. Gen. Genet., 143, 119-129

4. Frankenberg, D., M. Frankenberg-Schwager, D. Blöcher, and R. Harbich (1981), Radiat. Res., 88, 524-532

5. Taylor, A.M.R. (1978), Mutat. Res., 50, 407-418

6. Ahnström, G., and P.E. Bryant (1982), Int. J. Radiat. Biol., 41, 671-676

7. Bryant, P.E., R. Warring, and G. Ahnström (1984), Mutat. Res., 131, 19-26

8. Ahnström, G., and K. Erixon (1973), Int. J. Radiat. Biol., 23, 285-289

9. Ahnström, G., and K. Erixon (1981), in: E.C. Friedberg, and P.C. Hanawalt (Eds.), DNA Repair, Vol. 1, Part B, Marcel Decker, New York, pp. 403 -418

10. Rydberg, B. (1975), Radiat. Res. 61, 274-287

Lebenslauf

15. Dez. 1951	geb. in Offenbach/M.
1958 - 1962	Grundschule in Bad Vilbel
1962 - 1971	Gymnasium (Musterschule) in Frankfurt/M. mit Abschluß Abitur
1971 - 1973	Wehrdienst
1973 - 1979	Studium der Biologie an der J.W. Goethe-Universität in Frankfurt/M. mit Abschluß Diplom
1979 / 1980	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Mikrobiologie der J.W. Goethe-Universität
1980 - 1984	Doktorand bei der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung mbH in Frankfurt/M.; Anfertigung der Dissertation
11. Jan. 1984	Tag der Promotion